

XP-002403711

(C) WPI / Thomson

AN - 1993-284671 [36]

AP - JP19920082523 19920403

PR - JP19910212455 19910823

TI - Antioxidant for foods, cosmetics etc. - contains flexixanthin prepd.  
from flavobacterium as an active substance.

IW - ANTIOXIDANT FOOD COSMETIC CONTAIN PREPARATION FLAVOBACTERIUM  
ACTIVE

SUBSTANCE

PA - (KAIY-N) KAIYO BIOTECHNOLOGY KENKYUSHO KK

PN - JP5199858 A 19930810 DW199336

IC - A23L3/3499; C09K15/08

- C12P23/00; C12R1/20

AB - Antioxidant agent contg. flexixanthin as active substance is new.

Flexixanthin is prepd. by culturing bacteria belonging to

Flavobacterium sp. (e.g. KK 10202C registered as FERM P-12433) to form  
cultural material, and purifying the cultural material to give  
flexixanthin of formula (I).

- USE/ADVANTAGE :

The antioxidant is useful for prevention of oxidn. of foods,  
cosmetics, oil and fat or medicine, and is safer than butyl hydroxy  
anisole (BHA) or butyl hydroxy toluene (BHT).

In an example, KK 10202C was cultured in a medium contg. peptone

(5g/l), yeast extract (1g/l), glucose (2g/l), iron(II) phosphate

(0.04g/l), sodium acetate (0.01g/l), refined water (250ml) and sea

water (750ml), at 20 deg.C for 96 hrs. to cultural soln. The soln.

was extracted with acetone, condensed, and purified with silica gel

column to obtain flexixanthin (3mg). Alternatively, oil-phase of

flexixanthin (1.0%), and rape seed oil (39.1%), and water-phase of

L-ascorbic acid (2.0%), gallic acid (1.0%), quercetin (1.0%), locast

bean gum (0.1%) and water (53.9%) were mixed together to form liq.

antioxidant.

A08

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-199858

(43)公開日 平成5年(1993)8月10日

(51)IntCl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 L 3/3499		2114-4B		
C 0 9 K 15/08		6917-4H		
C 1 2 P 23/00		8931-4B		
// (C 1 2 P 23/00				
C 1 2 R 1:20)				

審査請求 未請求 請求項の数 2(全 5 頁)

(21)出願番号 特願平4-82523

(22)出願日 平成4年(1992)4月3日

(31)優先権主張番号 特願平3-212455

(32)優先日 平3(1991)8月23日

(33)優先権主張国 日本(J P)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成3年10月7日  
社団法人日本水産学会発行の「平成3年度日本水産学会  
秋季大会講演要旨集」に発表

(71)出願人 591001949

株式会社海洋バイオテクノロジー研究所  
東京都文京区本郷二丁目35番10号

(72)発明者 横山 昭裕

静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海  
洋バイオテクノロジー研究所内

(72)発明者 大滝 伸子

静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海  
洋バイオテクノロジー研究所内

(72)発明者 清水 延寿

静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海  
洋バイオテクノロジー研究所内

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 フレキシキサンチンを有効成分とする酸化防止剤及び

フレキシキサン

(57)【要約】 チンの製造法

【構成】 フレキシキサンチンを有効成分とする酸化防  
止剤、及びフラボバクテリウム属微生物を利用したフレ  
キシキサンチンの製造法。

【効果】 本発明の酸化防止剤は、安全性が高く、かつ  
優れた酸化防止能力を有する。また、本発明の製造法に  
よれば、酸化防止剤として有用なフレキシキサンチンを  
容易に提供することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フレキシキサンチンを有効成分として含有することを特徴とする酸化防止剤。

【請求項2】 フラボバクテリウム属に属しフレキシキサンチンを生産する能力を有する微生物を培地に培養し、得られた培養物からフレキシキサンチンを採取することを特徴とするフレキシキサンチンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、食品、化粧品、医薬、油脂等の酸化を防止するために用いられる酸化防止剤及びその有効成分の製造法に関するものである。

【0002】

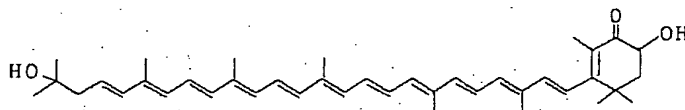
【従来の技術】 従来より、食品、化粧品、医薬、油脂等の酸化を防止するために酸化防止剤として、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）やジブチルヒドロキシトルエン（BHT）などが利用されてきたが、衛生学的な安全性に疑問がなげかけられ、化学合成品に対する拒否反応とともに天然化の方向をたどっている。従って、合成品に対する開発から、現在ではもっぱら天然物の中から酸化防止剤として利用できるものの検索へと研究の主流が移っている。天然の抗酸化性物質としては、すでに天然トコフェロール類、没食子酸とその誘導体、コーヒー酸とその誘導体、フラボン誘導体、糖、アミノ酸類とその誘導体及び香辛料類（セサモール、ローズマリーなど）などが知られている。これらの天然抗酸化性物質

は、抗酸化力が低く、単品ではさほどの酸化防止力が望めなく、また臭いがあったり、添加した製品を着色させるなどの欠点を示す物質もある。従って現在では、天然抗酸化性物質で抗酸化能が強い物質が求められている。一方、微生物の生産する抗酸化性物質としては、土壤中から分離したカビが抗酸化性のあるシトリニン、プロトカテキン酸を生産すること（Agr. Biol. Chem., 46, 23 69, 1982）、アスペルギルス・チェバリエリ（*Aspergillus Chevalieri*）が抗酸化性物質を生産すること（日本農芸化学会大会講演要旨集 1983）、ペニシリウム・ハーケイ（*Penicillium Herquei*）が抗酸化性物質を生産すること（日本農芸化学会大会講演要旨集 1983）、アスペルギルス・オリゼー（*Aspergillus oryzae*）が水溶性抗酸化性物質を生産すること（日本農芸化学会大会講演要旨集 1987）及びアスペルギルス・ニーガ（*Aspergillus niger*）の抽出物が強い抗酸化性を示すこと（J. Sci. fd. Agric., 26, 1357, 1975）などが知られている。しかしながら、これらの微生物が産生した抗酸化性物質のほとんどは、 $\alpha$ -トコフェロールとほぼ同程度の抗酸化性を示すものであり、実用上、より強い抗酸化力を有するものの開発が望まれている。

【0003】 一方、フレキシキサンチン（flexixanthin）は、次式：

【0004】

【化1】



で示される公知化合物であるが（Aasen, A. J. and Liaaen-Jensen, S., Acta Chemica Scandinavica, 20 (1966) 1970）、産業上の用途は知られておらず、また、フラボバクテリウム属微生物から得られた例はない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、従来の天然の抗酸化性物質よりも抗酸化力が強い天然由来の酸化防止剤を提供することを目的とする。また、本発明は、前記酸化防止剤の有効成分の製造法を提供することをも目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明の酸化防止剤は、フレキシキサンチンを有効成分として含有することを特徴とするものである。本発明の酸化防止剤において、有効成分として用いるフレキシキサンチンとしては、化学的に合成されたもの、微生物により製造されたもの、フレキシキサンチンを天然に含有するものなど又はそれらの抽出物、特に有機溶媒、好ましくはエタノールやアセトン抽出エキスの状態であってもよい。

【0007】 前記フレキシキサンチンは、必要に応じて

適宜精製して使用することも可能である。また、本発明の製造法で明らかにされたように、フレキシキサンチンは、フラボバクテリウム属に属しフレキシキサンチンを生産する能力を有する微生物を培地に培養し、得られた培養物からフレキシキサンチンを採取することによっても製造することができるので、かかる製造法に従って得られたものを用いてもよい。

【0008】 本発明の酸化防止剤において、粗抽出エキス又は精製したフレキシキサンチンを使用する場合、常法に従って前記有効成分を乳化剤又はシナジストとなるような化合物を加えて乳化化することができる。フレキシキサンチンを有効成分として含有する酸化防止剤は、その安全性や酸化防止能力により主に食品、化粧品及び医薬品における酸化防止成分として有用である。

【0009】 フレキシキサンチンの酸化防止剤としての使用量は添加する対象商品により異なるが、例えば食品に対しては0.1g/食品kg、化粧品に対しては0.05g/化粧品kgである。次にフレキシキサンチンの製造法について説明する。フレキシキサンチンは、フラボバクテリウム属に属しフレキシキサンチンを生産する能力を有する

微生物を培地に培養し、培養物中にフレキシキサンチンを生成蓄積させ、該培養物からフレキシキサンチンを採取することによって得ることができる。

【0010】フレキシキサンチン生産菌株としてはフラボバクテリウム属に属しフレキシキサンチン生産能を有する菌株であれば、いずれの菌株でも用いることができる。また、これらの菌株の人工的変異方法、例えば紫外線照射、X線照射、変異誘起剤処理などあるいは自然発生による変異株でもフレキシキサンチンを生産するものであれば、本発明に用いることができる。代表的菌株としてKK10202C株が挙げられる。

【0011】KK10202C株の菌学的性質について以下に述べるが、該性質の決定は清水らの方法【門田元，多賀信夫編：海洋微生物研究法，学会出版センターpp. 229 (1985)】に従った。形態学的検討は、光学顕微鏡を用い、特に孢子表面の形態については走査型電子顕微鏡によった。KK10202C株の菌学的性質は以下の通りである。

(1) グラム染色

陰性

(2) 形態

菌の形・大きさ：桿状， $1.3\mu\text{m}\times0.6\mu\text{m}$

運動性：あり

鞭毛：なし

(3) 菌体色素：橙色

(4) 生理的性質

オキシダーゼ：陰性

グルコース分解性：陰性

ゼラチン分解性：陰性

(5) OFテスト

陰性

以上の知見からKK10202C株をフラボバクテリウム属に帰属させるのが適当である。本属における種の同定においてはエズ・アール・クリーグ (N. R. Krieg)、ジェイ・ジイ・ホルト (J. G. Holt) 編、バージーズ・マニュアル・オブ・システマチック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) をもとに検索した。

【0012】検索の結果、KK10202C株の性質と一致する種を特定することは困難であり、KK10202C株をFlavobacterium sp. KK10202Cとして工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第12433号 (FERM P-12433) として寄託した (原寄託日：平成3年8月19日)。

上記微生物を一般に微生物の培養に用いられる培地で培養し、産生される抗酸化性物質を常法により採取する。

【0013】まず培養法について述べる。フラボバクテリウム属・sp. (Flavobacterium sp.) の培養には通常の培養方法を用いることができる。培地としては、窒化可能な炭素源、窒素源、無機物及び必要な生育、生産促進物質を程よく含有する培地であれば合成培地、天然培地いずれでも使用可能である。炭素源としては、グルコー

ス、澱粉、デキストリン、マンノース、フラクトース、シュクロース、ラクトース、キシロース、アラビノース、マンニトール、糖蜜などを単独又は組み合わせて用いられる。更に、菌の窒化能によっては炭化水素、アルコール類、有機酸なども用いられる。窒素源としては、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、コーン・スチープ・リカー、大豆粉、カザミノ酸などが単独又は組み合わせて用いられる。そのほか、食塩、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸第一鉄、塩化カルシウム、硫酸マンガ、硫酸亜鉛、硫酸銅などの無機塩類や海水を必要に応じて加える。更に、使用菌の生育やフレキシキサンチンの生産を促進する微量成分を適当に添加することができる。

【0014】培養法としては、液体培養法、特に深部攪拌培養法がもっとも適している。培養温度は $10\sim37^{\circ}\text{C}$ 、特に $22\sim30^{\circ}\text{C}$ が適当であり、培養中の培地のpHはアンモニア水や炭酸アンモニウム溶液などを添加して、 $4\sim10$ 、特に $6\sim8$ に維持することが望ましい。液体培養で通常 $1\sim7$ 日培養を行うと、目的物質のフレキシキサンチンが菌体中に生成蓄積される。培養物中の生成量が最大に達したときに培養を停止する。

【0015】培養物からのフレキシキサンチンの単離精製は、微生物代謝生産物をその培養物から単離精製するために常用される方法に従って行われる。例えば、培養物を濾過により培養濾液と菌体に分け、菌体を有機溶剤 (例えば、ヘキサン、ベンゼン、クロロホルム、アセトン、エーテル、酢酸エチルなど) で抽出する。ついで濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過 (Sephadex LH-20) 等でフレキシキサンチンを分離、精製する。なお、培養、精製操作中のフレキシキサンチンの動向は薄層クロマトグラフィーによるフレキシキサンチンの赤色を目安として追跡することができる。

【0016】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0017】

【実施例1】種菌としてFlavobacterium sp. KK10202C株を用いる。該菌株を500ml容量の三角フラスコ中のペプトン5g/L、酵母エキス1g/L、グルコース2g/L、リン酸第二鉄0.04g/L、酢酸ナトリウム0.01g/L、精製水250ml、海水750mlの組成を有する種培地 (殺菌前pH7.7) 12Lに植菌し、 $20^{\circ}\text{C}$ で96時間振とう (120rpm) 培養した。培養中、培地のpHは特に制御しなかった。

【0018】培養液を遠心分離し、菌体画分にアセトン200mlを添加し攪拌した後、沈澱物を濾別し、抽出液200mlを得た。抽出液を濃縮して50mlとし、分液ロート中にて酢酸エチル500mlと蒸留水500mlを添加し、液層分

配を行った。酢酸エチル層を硫酸ナトリウムで脱水した後、濃縮した。これを更にシリカゲルカラム（ナカライテスク社製シリカゲル60）を用い、クロロホルム：メタノール＝9：1で展開した。溶出された画分Aを濃縮すると赤色の濃縮液が得られた。画分Aは、高速液体クロマトグラフィー（ナカライテスク社製コスモシル5 S L、内径8mm長さ250mm、ヘキサン：アセトン＝8：2、流速1.2ml/分）で精製した。溶出された画分Bを濃縮し、フレキシキサンチン3mgを得た。このようにして得られたフレキシキサンチンは、水素核NMR、可視光吸光分析、質量分析において、公知ものと一致した。

#### 【0019】

【実施例2】実施例1で得られたフレキシキサンチンについて、メチレンブルーの光反応による一重項酸素の発生に起因する不飽和脂肪酸（リノール酸及びオレイン酸）の酸化に対するフレキシキサンチンの阻止効果（酸化防止効果）を見た。結果を表1に示す。

【0020】試験管中で、色素の一つであるメチレンブルー（1μg）を一重項酸素発生源として、1.0%（体積比）のステアリン酸、リノール酸及びオレイン酸を含むエタノール溶液（1ml）に溶解し、これにフレキシキサンチンを二段階の濃度（5及び0.5μg）で加えた。

これらの溶液に8000ルクスの白色光を照射し、30分後、メチレンブルーの光反応で発生した一重項酸素によるリノール酸及びオレイン酸の酸化による減少を次のようにして定量した。これらの反応液（1ml）に水（8ml）を加えた後、ヘキサン（1ml）で抽出し、このヘキサン溶液を毛細管ガスクロマトグラフィー（Fused Silica Capillary Column、0.25mm径、50m長、195°）で分析した。ステアリン酸を内部標準としリノール酸及びオレイン酸を面積法で定量した。フレキシキサンチンの酸化防止作用を同様の方法でα-トコフェロール（5及び0.5μg）、フレキシキサンチンとα-トコフェロールの併用（各0.5μg）、BHT（0.5μg）、及びコントロールと比較した。

【0021】その結果、フレキシキサンチンを加えた系ではその濃度に応じて脂質の酸化による減少が阻止されたのに対し、α-トコフェロール、BHTの脂質の酸化防止効果はフレキシキサンチンより劣った。またフレキシキサンチンはα-トコフェロールとの併用により相乗効果が見られた。

#### 【0022】

【表1】

試験区	酸化防止剤	光反応後の面積（%）	
		オレイン酸	リノール酸
1	フレキシキサンチン 5 μg	89.6	91.8
2	フレキシキサンチン 0.5 μg	89.4	91.3
3	トコフェロール 5 μg	88.7	90.2
4	トコフェロール 0.5 μg	87.6	90.1
5	フレキシキサンチン 0.5 μg + トコフェロール 0.5 μg	90.0	91.7
6	BHT 0.5 μg	87.3	90.2
7	なし（コントロール）	87.1	90.0

#### 【0023】

【実施例3】酸化防止剤の調製剤

フレキシキサンチン及び天然の濃縮フレキシキサンチン

を用いた酸化防止剤の製法

本発明で用いるフレキシキサンチンは化学的に合成されたフレキシキサンチンでも天然よりのフレキシキサンチン

ン又はその粗抽出エキスキでもよく、これらを単独で、又は適宜組み合わせ用い得る。フレキシキサンチン又はその粗抽出エキスキはエタノールに溶解し、水で希釈した後、これを直接使用することができるが、必要に応じて乳液状製剤を調製することができる。乳液状製剤を調製するに当たっては水相部に没食子酸、アスコルビン酸、ガム質、更にビタミンP（フラボノイド類）などを、また油相部にはフレキシキサンチンもしくはフレキシキサンチン粗抽出液、又はそれらの混合物を添加し、更にグリセリン脂肪酸エステル又は油脂、例えば菜種油、大豆油、コーン油等の通常の液状油を加えて乳化することにより容易に調製することが可能である。乳化は常法により、混合乳化すればよい。以下製剤例により更に詳しく説明する。

【0024】〔製剤例〕

油相部	(重量%)
フレキシキサンチン	1.0 %
菜種油	39.1 %
コハク酸グリセリド	2.0 %
水相部	
L-アスコルビン酸	2.0 %
没食子酸	1.0 %
ケルセチン（ビタミンP）	1.0 %

ローカストビーンガム	0.1 %
水	53.9 %

ローカストビーンガムを溶解させた水を65℃に加熱してから、没食子酸・ケルセチンとL-アスコルビン酸を混合し、予め65℃で混合、溶解しておいた油相部を混合、攪拌後ホモジナイザーを通し、均質化後10℃まで冷却して上記配合の液状製剤を得た。

【0025】

【発明の効果】本発明によれば、従来の天然の抗酸化性物質のみならず合成品であるBHTなどよりも強い抗酸化力を示す抗酸化性物質を簡易に製造することができる。また、本発明により製造された抗酸化性物質は変異原性も見られないため、食品、香料、色素、化粧品等、酸化により品質が著しく損なわれる製品に対して好適に添加することができる。更に、本発明により製造される抗酸化性物質は強力な抗酸化力を有するので医薬品としての用途も期待される。上記の効果に加えて、本発明により製造される抗酸化性物質は従来の天然酸化防止剤（例えばトコフェロールなど）と併用すると優れた相乗効果を示すので、本発明で製造される酸化防止剤と従来の天然酸化防止剤を例えば0.1/1～10/1（重量比）の割合で併用すると極めて効果的である。

フロントページの続き

(72)発明者 幹 渉

静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海  
洋バイオテクノロジー研究所内